製品コード RR430S
RR430A

研究用

TaKaRa

# SYBR® Fast qPCR Mix

説明書

v201509Da

SYBR Fast qPCR Mix は、SYBR Green I*を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR 専用試薬です。本製品は高速反応に適した変異型 *Taq* DNA ポリメラーゼと抗 *Taq* 抗体に最適化した反応液組成を組み合わせることで、プライマーダイマーの出現頻度が低い高速反応と幅広いダイナミックレンジでの正確なターゲットの定量、検出を再現性よく実現します。また、耐熱性 RNase H である Tli RNaseH をあらかじめ 2×プレミックス試薬中に添加しており、cDNA を鋳型とした場合の残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制できます。酵素と反応液組成の改良によりやや長めのターゲットや GC 含量の高いターゲットにも対応し PCR 阻害物質にも強い抵抗性を示します。2×濃度のプレミックスタイプ試薬で、リアルタイムモニタリングに適した濃度のSYBR Green I をあらかじめ含んでおり、反応液の調製が簡単です。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）
- LightCycler 96/LightCycler 480 System（Roche Diagnostics 社）
- CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System（Cepheid 社）

*：Molecular Probes, Inc. より研究用試薬として SYBR Green I ライセンスを受けています。

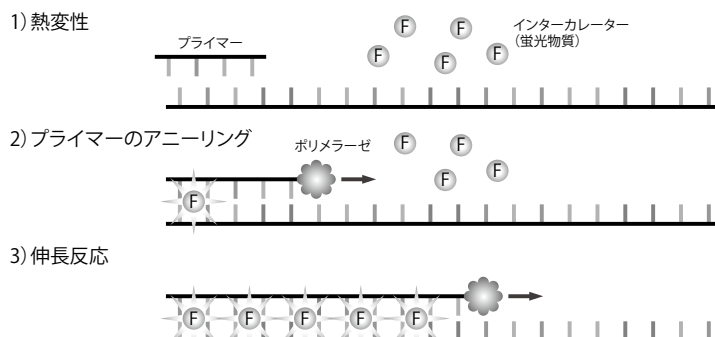
## I. 原理

本製品では、変異型 *Taq* HS による PCR 増幅を行います。PCR 増幅産物は、SYBR Green I によりリアルタイムでモニタリングできます。

### 1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。
本製品では、増幅にホットスタート PCR 用変異型 *Taq* DNA ポリメラーゼを使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

### 2. 蛍光検出法（インターカレーター法）

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。
ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。

## II. 内容［40 回（RR430S）／ 200 回（RR430A）、50 μl 反応系］

| | 製品コード RR430S | RR430A |
|---|---|---|
| SYBR Fast qPCR Mix（2×conc.）＊1 | 1 ml | 1 ml×5 |
| ROX Reference Dye（50×conc.）＊2 | 40 μl | 200 μl |
| ROX Reference Dye II（50×conc.）＊2 | 40 μl | 200 μl |

＊ 1：改良変異型 *Taq* HS、dNTP Mixture、$Mg^{2+}$、Tli RNaseH および SYBR Green I を含む。

＊ 2：Life Technologies のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye（50×）を添加する機種
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System（Life Technologies）
- StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆ ROX Reference Dye II（50×）を添加する機種
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- LightCycler 96/LightCycler 480 システム（Roche Diagnostics 社）
- CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System（Cepheid 社）

**本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）**

1. リアルタイム PCR 装置（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー＊
4. 滅菌蒸留水
5. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

＊： リアルタイム PCR 用プライマーの設計方法は、「VII.（1）プライマー設計について」をご参照ください。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、弊社のオンライン検索＆注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】のご利用を推奨いたします。（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

## III. 保存

4℃保存：6ヵ月安定

必ず遮光してください。また、コンタミネーションには十分注意してください。

本製品は－ 20℃輸送でお届けします。
長期保存の場合は、－ 20℃で保存してください。いったん使用を開始したチューブは4℃保存し、6 ヵ月を目途にご使用ください。

## IV. 特長

1. リアルタイム PCR により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。

2. SYBR Green I があらかじめミックスしてある 2×conc. のプレミックス試薬です。プライマーとテンプレートと滅菌蒸留水を加えるだけでインターカレーター法によるリアルタイム PCR を行うことができます。

3. PCR には、高速反応が可能となる変異型 *Taq* HS を用いています。バッファー系はリアルタイム PCR 用に至適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出ができます。

4. 2×プレミックス試薬中に、耐熱性 RNase H である Tli RNaseH をあらかじめ添加しています。cDNA を鋳型とした場合の、残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制します。

5. 酵素と反応液組成を改良することにより、PCR 阻害物質に対する抵抗性が向上しています。

## V. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用時には、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。
   ボルテックスによる混合は行わないでください。

   なお、SYBR Fast qPCR Mix（2×）を－ 20℃保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿を生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。
   沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

2. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

3. 本製品は SYBR Green I を含んでいます。反応液調製時に強い光をあてないよう注意してください。

4. 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

## VI. 操作

**【Thermal Cycler Dice Real Time System III、*II*、Single および *Lite* を用いる場合の操作方法】**

※ Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|---|---|
| SYBR Fast qPCR Mix（2×） | 12.5 μl | 1× |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 1 μl | 0.4 μM*1 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 1 μl | 0.4 μM*1 |
| template（＜ 100 ng）*2 | 2 μl | |
| $dH_2O$（滅菌蒸留水） | 8.5 μl | |
| Total | 25 μl*3 | |

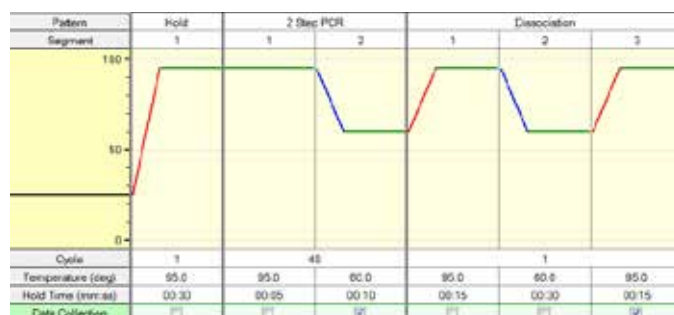
＊ 1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

＊ 3：反応液量は 25 μl を推奨

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。

シャトル PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒
2 Step PCR ＊ 4
Cycle：40
95℃　5 秒
60℃　10 秒
Dissociation

＊ 4：PCR 条件を至適化する場合は、12 ページの「実験条件の選び方」をご確認ください。

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している変異型 *Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書をご参照ください。

**【Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法】**

※ Life Technologies の各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

| 試薬 | 使用量 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|---|---|---|
| SYBR Fast qPCR Mix（2×） | 10 μl | 25 μl | 1× |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 0.8 μl | 2 μl | 0.4 μM*1 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 0.8 μl | 2 μl | 0.4 μM*1 |
| ROX Reference Dye（50×）or Dye II（50×）*2 | 0.4 μl | 1 μl | 1× |
| template*3 | 2 μl | 4 μl | |
| $dH_2O$（滅菌蒸留水） | 6 μl | 16 μl | |
| Total | 20 μl*4 | 50 μl*4 | |

＊1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2：ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されている。Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System および 7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50×）を使用する。
StepOnePlus および 7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye（50×）を使用する。

＊3：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μl あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

＊4：各装置の推奨容量に従って調製する。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。(PCR 条件を至適化する場合は、12 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。)

＜ Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus ＞

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
　Reps：1
　95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
　Reps：40
　95℃　 5 秒
　60℃　10 秒 ～ 15 秒＊
Stage 3：Melt Curve

＊：使用するFilter（FAM、ROX）を選択して、そのFilterによる検出可能な最短時間に設定してください。StepOnePlus は 10 秒の設定が可能です。

< Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System >

シャトル PCR 標準プロトコール

Holding Stage
  Reps：1
  95℃　30 秒
Cycling Stage
  Number of Cycles：40
  95℃　 3 秒
  60℃　12 秒 ～ 15 秒*
Melt Curve Stage

*：使用するFilter（FAM、ROX）を選択して、そのFilterによる検出可能な最短時間に設定してください。

| ※使用上の注意<br>本製品に使用している変異型 *Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。 |
|---|

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
   解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

**【 LightCycler 96/LightCycler 480 システムを用いる場合の操作方法 】**

※ Roche Diagnostics 社各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
| --- | --- | --- |
| SYBR Fast qPCR Mix（2×） | 10 μl | 1× |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 0.8 μl | 0.4 μM＊1 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 0.8 μl | 0.4 μM＊1 |
| template（＜ 100 ng）＊2 | 2 μl | |
| $dH_2O$（滅菌蒸留水） | 6.4 μl | |
| Total | 20 μl | |

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 〜 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、12 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）

＜ LightCycler 96 ＞

<u>シャトル PCR 標準プロトコール</u>

Stage 1：初期変性
94℃　30 秒　20℃/ 秒
1 サイクル

Stage 2：PCR 反応
94℃　5 秒　20℃/ 秒
60℃　10 秒　20℃/ 秒
40 サイクル

Stage 3：融解曲線分析
95℃　0 秒　20℃/ 秒
60℃　15 秒　20℃/ 秒
95℃　0 秒　0.1℃/ 秒

＜ LightCycler 480 システム＞

シャトル PCR 標準プロトコール

Denature
94℃　30 秒　（Ramp Rate 4.8℃/sec.）
1 サイクル

PCR
Analysis Mode：Quantificatio
94℃　 5 秒　（Ramp Rate 4.8℃/sec.）
60℃　10 秒　（Ramp Rate 2.5℃/sec.、Acquisition Mode：Single）
40 サイクル

Melting
Analysis Mode：Melting Curves
95℃　 5 秒　（Ramp Rate 4.8℃/sec.）
60℃　 1 分　（Ramp Rate 2.5℃/sec.）
95℃　　　　（Ramp Rate 0.11℃/sec.、Acquisition Mode：Continuous、Acquisitions：5 per℃）
1 サイクル

Cooling
50℃　30 秒　（Ramp Rate 2.5℃/sec.）
1 サイクル

※使用上の注意
本製品に使用している変異型 *Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3．反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

**【CFX96 リアルタイム PCR 解析システムを用いる場合の操作方法】**

※ CFX96 リアルタイム PCR 解析システム（Bio-Rad 社）の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|---|---|
| SYBR Fast qPCR Mix（2×） | 10 μl | 1× |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 0.8 μl | 0.4 μM＊1 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 0.8 μl | 0.4 μM＊1 |
| template（＜ 100 ng）＊2 | 2 μl | |
| $dH_2O$（滅菌蒸留水） | 6.4 μl | |
| Total | 20 μl | |

＊1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、12 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）

シャトル PCR 標準プロトコール

Sample volume：20 μl
Step1：95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
　GOTO：39（40 サイクル）
　95℃　　5 秒
　60℃　10 秒
Stage 3：Melt Curve

※使用上の注意
本製品に使用している変異型 *Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、CFX96 リアルタイム PCR 解析システムの取扱説明書をご参照ください。

**【Smart Cycler II System を用いる場合の操作方法】**

※ Smart Cycler System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|---|---|
| SYBR Fast qPCR Mix（2×） | 12.5 μl | 1× |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 1 μl | 0.4 μM＊1 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 1 μl | 0.4 μM＊1 |
| template（＜ 100 ng）＊2 | 2 μl | |
| $dH_2O$（滅菌蒸留水） | 8.5 μl | |
| Total | 25 μl | |

＊1：最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10%以下とする。

2. 反応チューブを Smart Cycler 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler にセットし、反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、12 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）

<u>シャトル PCR 標準プロトコール</u>

Stage 1：初期変性
　Hold
　95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
　Repeat：40 times
　95℃　 5 秒
　60℃　10 秒
Stage 3：Melt Curve

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している変異型 *Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Smart Cycler System の取扱説明書をご参照ください。

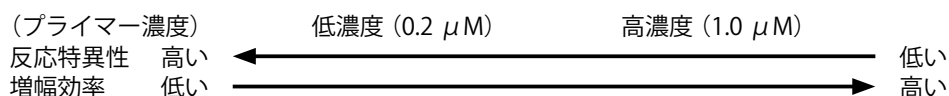
**実験条件の選び方**

推奨条件（シャトル PCR 標準プロトコール）で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。
実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

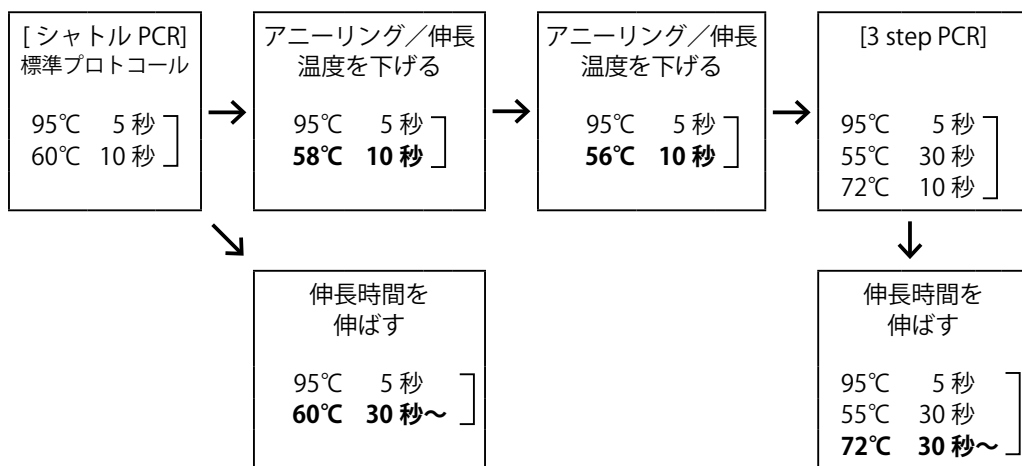
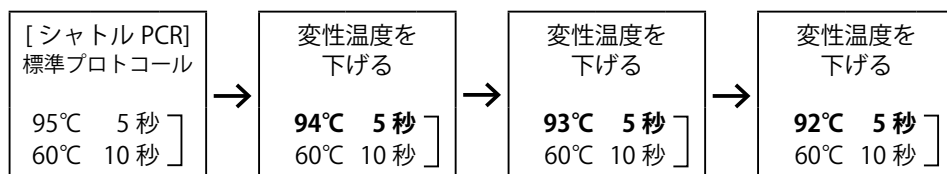
○ 反応特異性が高い実験系
・No Template Control でプライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じない。
・目的産物以外の非特異的増幅が生じない。

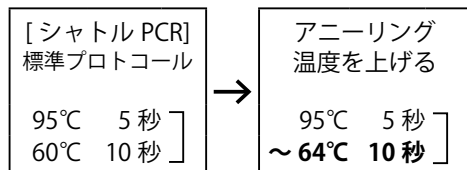
○ 増幅効率が高い実験系
・増幅産物がより早いサイクルで検出される（Ct 値が小さい）。
・PCR 増幅効率が高い（理論値である 100%に近い）。

【 プライマー濃度の検討 】

プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。

【PCR 条件の検討】

○ 増幅効率を上げるには—

(1) アニーリング／伸長温度を下げるか 3 step PCR に変更、または伸長時間を伸ばすことにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。

(2) 変性温度を 95℃から 1℃ずつ 92℃まで下げることにより、増幅効率が改善することがあります。

○ 反応特異性を上げるには—

アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。

○ 初期変性について

初期変性は通常 95℃、30 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鋳型の状態によっては、95℃、1 〜 2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

## VII. Appendix

### 1. プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。
なお、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、弊社オンライン検索 & 注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】*のご利用を推奨致します。
（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本キットと組合せて、SYBR Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
本システムを利用して RT-PCR プライマーを設計・合成された場合には、シャトル PCR 標準プロトコールで反応できます（5 〜 11 ページ参照）。

■増幅産物

| 増幅サイズ | 80 〜 150 bp が最適（300 bp までは増幅可能） |
|---|---|

■プライマー

| 長さ | 17 〜 25 mer |
|---|---|
| GC 含量 | 40 〜 60%（望ましくは、45 〜 55%） |
| Tm | Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異ならないこと。<br>Tm 値の計算は、専用のソフトウエアで行う。<br>OLIGO＊1 ：63 〜 68℃<br>Primer3＊2：60 〜 65℃ |
| 配列 | 全体的に塩基の偏りがない配列にする。<br>部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3' 末端）。<br>T/C の連続（polypyrimidine）は避ける。<br>A/G の連続（polypurine）は避ける。 |
| 3′ 末端配列 | 3′ 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける。<br>3′ 末端塩基は、G または C が望ましい。<br>3′ 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい。 |
| 相補性 | プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける。<br>プライマーの 3' 末端同士が 2 base 以上相補する配列を避ける。 |
| 特異性 | BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する＊3。 |

＊1：OLIGO Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights 社）
＊2：Primer3（http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/）
＊3：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

※ タカラバイオ（株）では、【Perfect Real Time サポートシステム】に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。
詳細は、弊社各支店までお問い合わせください。
（東京支店：TEL 03-3271-8553、関西支店：TEL 077-565-6969）

## 2. リアルタイム RT-PCR を行う場合

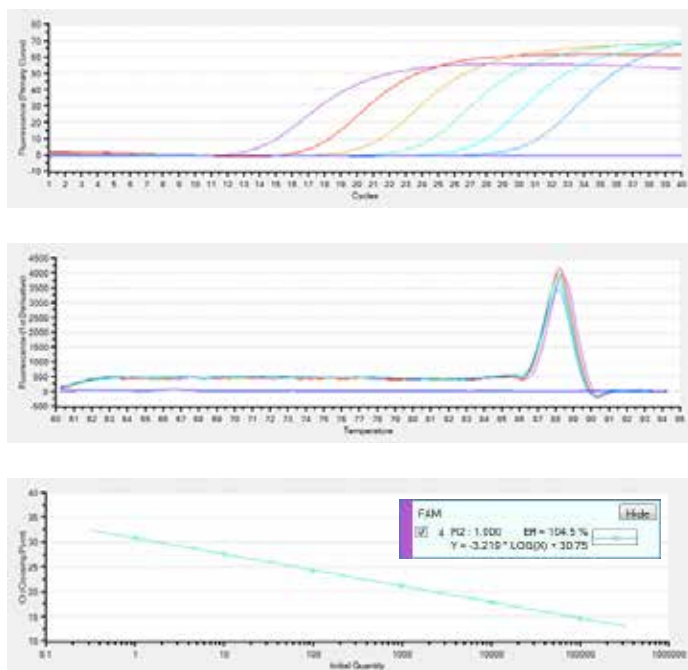
リアルタイム RT-PCR の逆転写反応には
・PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
・PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
・PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
の使用をお勧めします。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。

（1）PCR 反応液を下記の通り調製する。
（Thermal Cycler Dice Real Time System 使用の場合）
以下のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、22.5 ～ 24 μl ずつ分注する。

＜ 1 反応あたり＞

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|---|---|
| SYBR Fast qPCR Mix（2×） | 12.5 μl | 1× |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 1 μl | 0.4 μM |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 1 μl | 0.4 μM |
| dH$_2$O（滅菌蒸留水） | x μl | |
| Total | 22.5 ～ 24 μl | |

（2）反応液を分注したチューブに逆転写反応液を 1 ～ 2.5 μl 添加する。
注：PCR 反応への逆転写反応液の持込み量は、2.5 μl 以下にしてください。

■反応例

リアルタイム RT-PCR により Human ACTB mRNA を検出した。total RNA 1 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA および Negative Control として dH$_2$O を鋳型とした。

## VIII. 参考文献

1）吉崎美和、向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ　4. リアルタイム定量 PCR のコツ　p120-126

2）吉崎美和、向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析　p39-43

## IX. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B/L/W/LR/WR）
SYBR® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time)（製品コード RR091A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)（製品コード RR071A/B）
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR066A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)（製品コード RR086A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）

Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Smart Cycler II System（製品コード SC200N/SC210N）
Smart Cycler Software Version 2.0 Upgrade Kit（製品コード SC220）
Perfect Real Time サポートシステム＊
（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本キットと組合せて、SYBR Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

## X.　注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Molecular Probes, Inc. の登録商標です。*Premix Ex Taq*、DimerEraser、PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201509Da